培養線維芽細胞の増殖とコラゲン線維形成

松 尾 朗 矢 嶋 俊 彦

東日本学園大学歯学部口腔解剖学第1教室

〔受付：昭和59年9月18日〕

Cell proliferation and collagen fibrogenesis of cultured fibroblasts

Akira Matsuo and Toshihiko Yajima

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Higashi-Nippon-Gakuen University, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido, 061-02

[Received for publication September 18, 1984]

Key words: fibroblast / cell proliferation / collagen fibrogenesis / ascorbic acid / diphenylhydantoin

Abstract: The effects of various concentrations of serum, ascorbic acid, and sodium diphenylhydantoin (DPH) in culture medium on cell proliferation and collagen fibrogenesis were morphologically investigated in rat skin fibroblasts.

The cell proliferative rate appeared to be dependent upon the serum concentration both in α MEM and DM-160 medium. But, the rate in α MEM medium was much higher than that in DM-160 medium. Fibroblasts in α MEM medium produced extracellular fibers stained positively by silver impregnation as early as 1 day after planting and accumulated collagen fibers in the intercellular matrix continuously throughout their logarithmic growth. This fibrogenesis was not affected by the serum concentration in the culture medium. The degree of fibrogenesis in DM-160 medium was less up to 3 weeks, and the amount of collagen in the cell layer increased thereafter.

Fibroblasts grown in DM-160 medium containing less than 1 μ g/ml ascorbic acid showed evidence of ascorbic acid deficiency when compared with cells grown in α MEM medium containing 50 μ g/ml ascorbic acid. Ultrastructural study demonstrated that ascorbic acid deficiency prevented the deposition of typical 64 nm-banded collagen fibrils; instead, finer, unbanded fibrils and microfibrils were deposited extracellularly. These results indicate that the fibroblasts require ascorbic acid to produce collagen fibers.

Addition of DPH to cultured fibroblasts resulted in stimulation of their proliferation and enhancement of collagen fibrogenesis.

緒 言

培養線維芽細胞における細胞増殖とコラゲン生成および線維形成に関しては、数多くの研究がなされてきている¹⁻¹³⁾。その報告の多くで、線維芽細胞のコラゲン分子の生成と分泌は、増殖対数期を含む全発育相を通して認められるが、コラゲン線維形成と蓄積は、定常期に入った後に行なわれるとしている^{1,2)}。増殖対数期の終りから定常期

に入ると、プロトコラゲンのプロリン水酸化酵素とリジン水酸化酵素活性が急激に高まることが、生化学的に明らかにされている^{4,14)}。このため、細胞のコラゲンの生成と分泌が高まると共に、ハイドロキシプロリン含量の多い、変性温度の高い安定した不溶性コラゲンヘリックスが作られ¹⁵⁾、線維形成がなされるものと考えられている。また、これらの水酸化酵素の活性化因子としてアスコルビン酸が必要であり、アスコルビン酸添加群では、活発なコラゲン生成と線維形成が行

なわれると報告されている^{3,8,10)}。他方、アスコルビン酸は培養液中では、分解変性してしまうことも知られており、特にアスコルビン酸の線維形成への作用については形態学的にも結果の一致をみていない。

また、臨床的には、抗痙攣剤のジフェニルヒダントイン (sodium diphenylhydantoin, DPH) の投与に伴う、歯肉でのコラーゲン線維の過形成による歯肉肥大がしばしばみられる。その発症機序は明らかではないが、口腔内の局所因子が強く作用しているとする考えが現在主流を占めている。しかし、培養を用いた基礎的研究から、DPH が線維芽細胞の代謝過程に直接的に働くとの推測も報告されている¹⁶⁻¹⁹⁾。

そこで、本研究では培養系を用いて、線維芽細胞の増殖とコラーゲン線維形成に対する、培地、血清濃度、アスコルビン酸と DPH の影響について、形態学的に検討を試みた。

材料および方法

1. 培養細胞と培地

実験には、ラット背側皮膚の真皮に由来した線維芽細胞系、RSF-1、を用いた。

培地は、 α -MEM 培地 (アスコルビン酸含量 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, Flow Laboratories Inc., California, U.S.A.) DM-160培地 (アスコルビン酸含量 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, 極東, 東京) と Eagle の MEM 培地 (アスコルビン酸不含有, Flow Laboratories Inc.), および MEM 培地にアスコルビン酸 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$, 和光純薬, 大阪) を添加したものを使用した。これらの培地に仔ウシ血清 (Armour Pharmaceutical Co., Illinois, U.S.A.) を 1, 5, 10% 加え培養に用いた。

また、実験群の 1 つには、DPH (5, 20, 40, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した。DPH (アレビアチン®, 大日本製薬, 大阪) は、0.1M NaOH で希釈したものを用い、対照群には DPH 添加量と等量の 0.1M NaOH を加えた。

2. 培養法

線維芽細胞 (6×10^4 cells/dish) は、35mm プラスチック培養シャーレ (Nunc, Roskilde, Denmark) に 5% 仔ウシ血清を添加した α -MEM 培

地 (α -MEM-5%) を加え、炭酸ガス培養器 (5% CO_2 -95% air, 37°C) で培養された。細胞は、 α -MEM-5% 培地で 24 時間培養後、各実験群の培養液に交換され、実験が開始された。培養液は 3 日ごとに交換された。

3. コラーゲン線維形成の観察

培養物はシャーレのまま 10% 中性ホルマリンで固定後、Bielshowsky-Gömöri 渡銀染色を施し、光顕にて、コラーゲン線維形成を比較観察した。

また、一部試料では、同一部位で、Van Gieson 染色 (Hansen 改良法) と鉄コロイド染色による酸性粘液多糖類の検出を行った。

さらに、グルタルアルとオスミック酸の二重固定後、通法による電顕観察を合せて行なった。

結 果

1. 培地と血清濃度の影響

a. 細胞増殖

α -MEM 培地における、5% 血清 (α -MEM-5%) と 10% 血清添加 (α -MEM-10%) 群での、それぞれの細胞増殖率は最初の 3 日間で 4.9 と 5.4、次の 3 日間で 1.5 と 2.1、6-9 日間で 1.4 と 1.3 であった。細胞は培養 3-6 日まで対数的に増殖

Fig. 1 Comparison of the proliferation rate of fibroblasts at various serum concentrations in α -MEM and DM-160 media.

し、6日以降では増殖率は低下し、定常期に入ったことを示した (Fig. 1)。1%血清添加 (α -MEM-1%) 群では、その増殖曲線はやや異なり、培養9日間での増殖率は2.9であった (Fig. 1)。

DM-160培地の5%血清添加 (DM-5%) 群での細胞増殖率は最初の3日間で2.3、次の3日間で1.3、そして、6-9日間で1.2であった (Fig. 1)。増殖率は全体に低いが、 α -MEM-5%、 α -MEM-10%とほぼ同様な増殖曲線をえがいた。しかし、1%血清添加 (DM-1%) 群では、培養8日間で増殖は認められなかった。

b. 線維形成

α -MEM-5%では、培養24時間以内に渡銀される細線維が、細胞周囲にすでに形成されていた (Fig. 2a)。これらの線維は増殖対数期を通して増加し、培養9-14日の定常期には培養シャーレの全面で、網目状線維シートを形成した (Fig. 2b)。しかし、DM-5%では、培養14日まで渡銀される線維はほとんど認められなかった (Fig. 2c)。

α -MEM-5%で培養14日では、渡銀される線維は Van Gieson 染色されなかったが、4週間以上培養したものではフクシン染色され、成熟コラゲン線維として観察された (Fig. 3a, c)。また、同じ部位は鉄コロイド染色陽性であり、線維形成と同時に多量の酸性粘液多糖類が形成されていた (Fig. 3b)。

α -MEM-5%で活発に線維形成をしている線維芽細胞は、やや拡張した粗面小胞体とよく発達したゴルジ装置を有していた。細胞外には64nmの横紋構造を有する多数のコラゲン原線維が観察さ

れた (Fig. 4a)。他方、DM-5%で光顕的に線維形成がほとんど認められない線維芽細胞では、拡張した粗面小胞体はみられたが、ゴルジ装置は発達していなかった。細胞外に横紋構造を有する線維はごく少数しかみられなかったが、横紋構造のない細線維と microfibrils の集合がしばしば観察された (Fig. 4b)。

次にこのようなコラゲン線維形成状態をより定量化して比較するため、線維形成インデックス (histological fibrogenesis index, 0-5) を作成した (Fig. 5)。

0 : 線維が全く形成されていない。

1 : 細い線維が一部の細胞周囲のみに形成されている。

2 : 細く、短かい線維が、ほとんど全ての細胞周囲に形成されている。

3 : 線維が、シャーレ全体に粗な網状構造を形成している。

4 : 線維が、シャーレ全体に密な網状構造を形成している。

5 : 線維は、シャーレ全体に密で厚いシート状構造を形成している。

α -MEM 培地では、増殖対数期 (0-6日) を通して index は上昇し、定常期に入る6-9日で index 4 のプラトーに達した。培養4週間以上のものでは index 5 を示すものもあった。培養1日で α -MEM-5%と α -MEM-1%では index 2 の線維形成が認められたが、 α -MEM-10%では index 1 であった (Fig. 6)。

DM-5%では、培養1日でシャーレ当たり数本の線維が観察されたが、14日の培養期間を通し増加せず、index 1 であった (Fig. 6)。しかし、培

Fig. 2 Micrographs of fibroblast cultures stained by silver impregnation. a: 1-day-old culture in α -MEM-5% medium, showing the localization of fibers on the cells. b: 9-day-old culture in α -MEM-5% medium, showing a tangle of fibers covering the cell layer. c: 14-day-old culture in DM-5% medium, showing deeply stained nuclei and no fibers. a-c, $\times 150$.

Fig. 3 Results of three different stains of the same area of a fibroblast culture maintained in α -MEM-5% medium for 6 weeks. a: Van Gieson stain. b: Colloidal iron stain. c: Silver impregnation. Distribution of positively stained materials is identical with that of collagen fibers. a-c, $\times 150$.

Fig. 4 Electron micrographs of 9-day-old cultures. a: Fibroblast cultured in α -MEM-5% medium, showing highly developed rER and Golgi complex. Collagen fibrils with typical 64 nm cross-striation occupy the intercellular space. b: Fibroblast cultured in DM-5% medium. Fine, unbanded fibrils and microfibrils constitute the extracellular matrix. a and b, $\times 20,000$.

Fig. 5 Criteria for the scoring the histological fibrogenesis index of fibroblast cultures. The results obtained by silver impregnation were scored from 0 to 5 on an arbitrary scale.

- 0: No fibers in culture.
- 1: Thin fibers are formed only in a limited area.
- 2: Thin fibers are formed on the periphery of most cells.
- 3: Fibers form coarse network structure.
- 4: Fibers form dense network structure.
- 5: Fibers form dense continuous sheet-like structure covering the whole culture.

養3週から線維が増加し、2カ月の長期培養では index 3-4の線維形成がみられた。

2. アスコルビン酸の影響

5%血清を加えたアスコルビン酸を全く含まない Eagle の MEM 培地 (MEM-5%) では、培養14日間で渡銀される線維は全く認められなかった (Fig. 7a)。しかし、MEM-5% にアスコルビン酸を $50\mu\text{g/ml}$ 添加した群では、培養1日で線維形成が認められた。線維形成 index は $\alpha\text{MEM-5\%}$ のそれとほぼ同様の経過を示し、培養3日で index 3, 6日で index 4 となった (Fig. 7b)。

3. DPH の影響

a. 細胞増殖

DPH を $\alpha\text{MEM-5\%}$ に添加した実験群の増殖曲線は、DPH 無添加の対照群とほぼ同様な経過

を示した。培養3-6日まで対数的増殖をし、それ以後増殖率は低下し、定常期に入った (Fig. 8)。DPH 濃度が $5-40\mu\text{g/ml}$ では、対照群 ($\alpha\text{MEM-5\%}$) に比較し細胞増殖率はやや高く、培養9日で対照群の約1.5倍となった。しかし、 $\alpha\text{MEM-10\%}$ の増殖率を越えることはなかった。

DM-5% に DPH ($20\mu\text{g/ml}$) を添加したもののでも、培養9日で対照の約1.5倍の細胞増殖がみられた。

b. 線維形成

DPH を $\alpha\text{MEM-5\%}$ に $5-40\mu\text{g/ml}$ 添加したものでは、その線維形成において、培養6日で対照群との明確な差異は認められなかった。しかし、培養9日頃から DPH 添加群での線維形成が高まり、14日では対照群 ($\alpha\text{MEM-5\%}$) と α -

Fig. 6 Comparison of the time course of fibrogenesis by fibroblasts at various serum concentrations in α MED and DM-160 media (see Fig. 5 and text for description of the histological fibrogenesis index).

MEM-10%の線維形成 index は4であったのに対して、DPH 添加群はシャーレ全面に均一で厚い線維シートを形成しており index 5であった (Fig. 9)。DPH 100 μ g/ml の添加は、線維形成においても、やや抑制的に作用した。

また、DM-5%への DPH (20 μ g/ml) 添加群では、培養9-14日間で線維形成作用を示さなかった。

考 察

1. 培地と血清濃度の影響

細胞増殖率は、50 μ g/ml のアスコルビン酸を含む α -MEM 培地では血清濃度依存性を示し、培地培養9日で5%と10%血清群は1%血清群の3.4倍と4.9倍であった。一方、1 μ g/ml のアスコルビン酸を含む DM-160培地では、5%血清群は α -MEM の1%血清群に近い増殖率を示した。しかし、1%血清群では細胞の増殖がみられなかった。DM-160培地は、アスコルビン酸を除く他の組成成分の多くは α -MEM 培地と同等かそれ以上に含有していることから、アスコルビン酸は線維芽細胞の増殖に対して直接または間接的に作用し

Fig. 7 Micrographs of fibroblast cultures in MEM-5% medium with and without ascorbic acid-supplementation, stained by silver impregnation. a: 9-day-old culture with ascorbic acid deficiency, showing absence of fibers in the cell sheet. b: 3-day-old culture receiving ascorbic acid (50 μ g/ml). Abundant and thicker collagen fibers have overgrown the cell sheet. a and b, $\times 150$.

Fig. 8 Effect of various concentrations of diphenylhydantoin (DPH) on fibroblast proliferation.

ていることが推測された。

α-MEM 培地での線維形成は血清濃度依存性が見られず, 1-10%血清群でほぼ同様の傾向を示した (Fig. 6)。培養1日で明らかな線維形成が始まり, 増殖対数期を通して線維形成 index が上昇した。この結果は線維形成条件と環境が整えば, 増殖誘導期と対数期でも線維形成が行われることを示す興味ある結果である。長期間培養で線維形成 index が高まらないのは, 線維形成と同時に形成されたコラーゲン線維の消化・分解が起っているためと考えられる。

2. アスコルビン酸の影響

細胞増殖率と同様に, 線維形成における α-MEM 培地と DM-160培地の大きな差異は, アスコルビン酸含有量によることが推測された。アスコルビン酸を全く含有しない Eagle の MEM 培地では明らかなコラーゲン線維形成は認められなかったが, 50 μg/ml のアスコルビン酸添加により α-MEM 群とほぼ同様の細胞増殖と線維形成が観

Fig. 9 Micrographs of fibroblast cultures in αMEM-5% medium with and without DPH for 14 days, stained by silver impregnation. a: Non DPH-supplemented culture. b: DPH (5 μg/ml)-supplemented culture. Note the increase in fibers. a and b, ×150.

察された。また、電顕観察からも DM 培地と MEM 培地群の細胞は横紋構造を有するコラーゲン原線維は形成しておらず、主に弾性線維の microfibrils を形成していた。これに対して、 α -MEM 培地と MEM 培地にアスコルビン酸 ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) 添加群の細胞は、 64nm の横紋を有するコラーゲン原線維を形成し、形成した基質線維束に埋め込まれていた。これらの結果は、Schafer 等⁹⁾と Levene 等¹⁰⁾の結果によく一致し、アスコルビン酸 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有の DM 培地では、アスコルビン酸欠乏状態であることを示している。

培養液中のアスコルビン酸は、プロトコラーゲンのプロリン水酸化酵素とリジン水酸化酵素を活性化し、コラーゲン分子中のプロリンとリジンを水酸化する^{5,9,13)}。コラーゲン分子の分泌量⁹⁾と変性温度¹⁵⁾はヒドロキシプロリン含量に比例し上昇するので、アスコルビン酸存在下では、変性温度の高い安定なコラーゲン分子が多量に分泌されると考えられる。また、ヒドロキシリジンによるコラーゲン分子間の架橋形成は、塩や酸に不溶性のコラーゲンを増加させることが知られている^{6,7)}。さらに最近、アスコルビン酸のプロコラーゲン mRNA への直接作用を示唆する報告もある。このように、アスコルビン酸はプロコラーゲン分子中のプロリンとリジンの安定性と不溶化に関与し、コラーゲンヘリックスの安定化と不溶化、さらに分泌を促進し、細胞外でのコラーゲン線維形成に作用したと考えられる。さらに形成された基質線維は細胞接触による増殖阻止に影響し、増殖率に変化をもたらしたと思われる。

アスコルビン酸は溶液中では不安定であり、 α -アミノ酸と共存すると容易に不可逆的分解を受ける²⁰⁾。培養液中のアスコルビン酸は 37°C 、24時間 で 88-99% が分解されていると報告されている⁵⁾。しかし、アスコルビン酸添加群では活発なコラーゲン線維形成が観察され、アスコルビン酸の分解と線維形成との関係については、さらに詳細な生化学的・形態学的研究が必要である。他方、アスコルビン酸はプロリンとリジンの水酸化酵素の特異的な因子ではなく、他の還元剤によっても代用できることも明らかにされている¹¹⁾。アスコルビン酸欠乏状態で長期培養における線維形成

は、血清中の少量のアスコルビン酸や他の還元因子とその蓄積、それに低いコラーゲン生成量とが作用して、安定なコラーゲンが合成されたことによるものと考えられる。

プロリン水酸化酵素活性に作用するアスコルビン酸濃度は、一般には $25-50\mu\text{g}/\text{ml}$ とされているが、ある種の線維芽細胞では約 $0.08\mu\text{g}/\text{ml}$ で有効との報告もある⁹⁾。このようなアスコルビン酸の細胞による有効濃度の差異と不安定性が、コラーゲン線維形成におけるアスコルビン酸作用の結果の不一致の理由の一つと考えられる。

3. DPH の影響

ダイランチン性歯肉肥大の発症原因としては、口腔内の局所的因子が強く作用しているとの考えが強い。またこの発現と進行にはアレルギー反応、血管や血液の変化、あるいは内分泌異常によるものとする全身的な因子を無視することができないことも報告されている。しかし一方、DPH によって線維芽細胞の増殖が活性化され¹⁶⁻¹⁹⁾、組織像においてもコラーゲン線維の増殖を認める報告も多い。我々の結果でも、DPH は細胞増殖と線維形成の両面での促進効果がみられた。他方 Goultschin & Shoshan²¹⁾は DPH のコラーゲン分解の抑制による結果、線維形成量が増加したと報告している。また Hassell 等²²⁾はヒト正常歯肉由来の培養線維芽細胞に対して DPH が無効であったことを報告している。細胞の DPH 感受性の差異が、報告される実験結果の不一致の要因とも考えられる。

DPH 感受性線維芽細胞では、DPH が細胞の代謝過程に何らかの影響を与えていることは明らかと思われる。

結 論

ラット背側皮膚由来の線維芽細胞を用いて、細胞の増殖とコラーゲン線維形成に対する培地、血清濃度、アスコルビン酸と DPH の影響を検討して、以下の結果を得た。

1. 細胞増殖率は α -MEM 培地（アスコルビン酸含有量 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ）と DM-160 培地（アスコルビン酸含有量 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）で共に、血清濃度依存性を示した。しかし、この増殖率は α -MEM 培地

ではより高かった。

2. コラゲン線維形成は、細胞の増殖対数期と定常期を通して認められた。しかし、培地によりその形成状態は大いに異った。 α -MEM 培地では、線維形成率は血清依存性が認められず、形成量は高く、定常期に入るとプラトーに達した。しかし、DM-160 培地では、線維形成率は低く、長期培養（3 週以後）で初めて形成量の増加がみられた。

3. 培養線維芽細胞でのコラゲン線維形成にはアスコルビン酸を必要とし、その添加は有効であ

った。 α -MEM 培地と DM-160 培地における、線維形成の大きな差異は、アスコルビン酸含有量の差によるもので、DM-160 培地の $1 \mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸では、その欠乏状態にあることが明らかとなった。

4. DPH は細胞増殖とコラゲン線維形成の両者を促進した。しかし、DPH の作用機序については、さらに詳細な研究が必要と思われる。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金（課題番号 58480368）による。

抄録：ラット皮膚由来の線維芽細胞を用いて、細胞増殖とコラゲン線維形成に対する培地、血清濃度、アスコルビン酸とジフェニルヒダントイン（DPH）の影響を形態学的に研究した。

細胞増殖率は、 α -MEM 培地と DM-160 培地で共に、血清濃度依存性を示した。しかし、 α -MEM 培地での増殖率は、DM-160 培地のものより高かった。 α -MEM 培地では、線維芽細胞は培養 1 日で渡銀される線維を形成し、増殖対数期と定常期を通して細胞外にコラゲン線維を形成・蓄積した。DM-160 培地での線維形成率は培養 3 週まで低く、その後、コラゲン線維量の増加がみられた。

DM-160 培地（アスコルビン酸含有量 $1 \mu\text{g/ml}$ ）の線維芽細胞は、 α -MEM 培地（アスコルビン酸含有量 $50 \mu\text{g/ml}$ ）の細胞に比べて、アスコルビン酸欠乏状態であった。これらアスコルビン酸欠乏状態では、典型的な 64 nm 横紋を持つコラゲン線維形成は阻害され、横紋のない、細線維と microfibrils が形成されていた。これらの結果は、この線維芽細胞はコラゲン線維形成にアスコルビン酸を必要とすることを明らかにした。

培養線維芽細胞への DPH の添加は、細胞増殖とコラゲン線維形成の両者を促進した。

文 献

- Green, H. and Goldberg, B.: Kinetics of collagen synthesis by established mammalian cell lines. *Nature* **200**: 1097-1098, 1963.
- Goldberg, B. and Green, H.: An analysis of collagen secretion by established mouse fibroblast lines. *J. Cell Biol.* **22**: 227-258, 1964.
- Schafer, I. A., Silverman, L., Sullivan, J. C. and Robertson, W. van B.: Ascorbic acid deficiency in cultured human fibroblasts. *J. Cell Biol.* **34**: 83-95, 1967.
- Layman, D. L., Narayanan, A. S. and Martin, G. R.: The production of lysyl oxidase by human fibroblasts in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* **149**: 97-101, 1972.
- Peterkofsky, B.: The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblast. *Arch. Biochem. Biophys.* **152**: 318-328, 1972.
- Levene, C. I., Shoahan, S. and Bates, C. J.: The effect of ascorbic acid on the cross-linking of collagen during its synthesis by cultured 3T6 fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **257**: 384-388, 1972.
- Levene, C. I., Bates, C. J. and Bailey, A. J.: Biosynthesis of collagen cross-links in cultured 3T6 fibroblast; Effect of lathyrogens and ascorbic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **263**: 574-584, 1972.
- Levene, C. I. and Bates, C. J.: Ascorbic acid and collagen synthesis in cultured fibroblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **258**: 288-306, 1975.
- Blank, T. J. J. and Peterkofsky, B.: The stimulation of collagen hydroxylation in chick embryo fibroblast. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**: 259-267, 1975.
- Levene, C. I., Ockleford, C. P. and Barber, C. L.: Scurvy; a comparison between ultrastructural and biochemical changes observed in cultured fibroblasts and the collagen they synthesise. *Virchows Arch. B Cell Path.* **23**: 325-338, 1977.
- Chen, K. H., Evans, C. A. and Gallop, P. M.: Prolyl and lysyl hydroxylase activation and cofactor specificity in young and senescent WI-38 fibroblast cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**: 1631-1636, 1977.
- Tajima, S. and Pinnell, S. R.: Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid, Ascor-

- bic acid increases type I procollagen mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106** : 632-637, 1982.
- 13) Sodek, J., Feng, J., Yen, E. H. K. and Melcher, A. H. : Effect of ascorbic acid on protein synthesis and collagen hydroxylation in continuous flow organ cultures of adult mouse periodontal tissues. *Calcif. Tiss. Int.* **34** : 408-415, 1982.
- 14) Chen-Kiang, S., Cardinale, G. J. and Udenfriend, S. : Homology between a prolyl hydroxylase subunit and a tissue protein that crossreacts immunologically with the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** : 4420-4424, 1977.
- 15) Rosenblom, J. and Harsch, T. : Hydroxyproline content determines the denaturation temperature of chick tendon collagen. *Arch. Biochem. Biophys.* **158** : 478-484, 1973.
- 16) Shafer, W. G. : Effect of Dilantin Sodium on growth of human fibroblast-like cell cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **104** : 198-201, 1960.
- 17) Shafer, W. G. : Effect of Dilantin Sodium analogues on cell proliferation in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **106** : 205-207, 1961.
- 18) Shafer, W. G. : Effect of Dilantin Sodium on various cell lines in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **108** : 694-696, 1961.
- 19) Shafer, W. G. : Response of radiated human gingival fibroblast-like cells to Dilantin Sodium in tissue culture. *J. Dent. Res.* **44** : 671-677, 1965.
- 20) 荒川信彦：アスコルビン酸とその関連化合物の化学。(日本ビタミン学会編)ビタミン学Ⅱ, p. 569-578, 化学同人, 東京, 1980.
- 21) Goultchin, J. and Shoshan, S. : Inhibition of collagen breakdown by diphenylhydantoin. *Biochim. Biophys. Acta* **631** : 188-191, 1980.
- 22) Hassell, T. M., Page, R. C., Narayanan, A. S. and Cooper, C. G. : Diphenylhydantoin (Dilantin) gingival hyperplasia: Drug-induced abnormality of connective tissue. *Proc. Natl. Sci. USA.* **73** : 2909-2912, 1976.